

学校编码: 10384  
学号: 200426147

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
MDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文

海洋真菌 **BYY-1** 代谢产物 **Clavatol** 的发酵条件  
及生物活性研究

**Study on the Culture Conditions and Bioactivities of Clavatol  
from Marine-Derived Fungi BYY-1**

黄 珊 珊

指导教师姓名: 郑忠辉 教授  
专 业 名 称: 微 生 物 学  
论文提交日期: 2007 年 7 月 10 日  
论文答辩时间: 2007 年 8 月 8 日  
学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 沈月毛 教授  
评 阅 人:

2007 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：                    日期：      年      月      日

导师签名：                    日期：      年      月      日

# 目 录

摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
前言 .....	1
1 海洋真菌次生代谢产物的研究概况 .....	1
1.1 抗肿瘤活性化合物 .....	5
1.2 抗菌活性化合物 .....	8
1.3 其它活性化合物 .....	12
2 肿瘤细胞的凋亡机制 .....	14
2.1 细胞凋亡的死亡受体途径 .....	15
2.2 Caspases .....	17
2.3 细胞凋亡的线粒体途径 .....	18
3 本课题研究目的和意义 .....	18
材料与方法 .....	20
1 材料 .....	20
2 方法 .....	26
结果与分析 .....	38
1 Clavatul 发酵培养基的优化 .....	38
1.1 Clavatul 的定量工作曲线 .....	38
1.2 Clavatul 发酵培养基及发酵方法的选择 .....	38
1.3 正交实验 .....	40
2 Clavatul 的发酵制备 .....	41
2.1 摇瓶发酵 .....	42
2.2 分离纯化 .....	43
3 化合物 Clavatul 的生物活性 .....	43
3.1 抗菌活性 .....	43
3.2 对酪氨酸酶的抑制作用 .....	43
3.3 对乙酰胆碱酯酶的抑制作用 .....	46

3.4 Clavatol 的抗氧化活性.....	48
3.5 Clavatol 的体内外抗肿瘤活性及作用机制.....	50
3.6 化合物 Clavatol 的急性毒性实验和抑瘤活性实验.....	61
3.7 BYY-1 菌株的分子鉴定.....	63
<b>讨论与结论.....</b>	<b>66</b>
<b>1 海洋真菌 BYY-1 次级代谢产物 Clavatol 的生物活性 .....</b>	<b>66</b>
1.1 Clavatol 抑制酪氨酸酶的活性.....	66
1.2 Clavatol 抑制乙酰胆碱酯酶的活性.....	68
1.3 Clavatol 抗氧化活性.....	69
1.4 Clavatol 诱导肿瘤细胞凋亡.....	70
<b>2 化合物 Clavatol 发酵条件的优化 .....</b>	<b>73</b>
<b>3 结论与展望 .....</b>	<b>75</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>78</b>

## Catalogue

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>III</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Advace on Metabolotes from Marine-derived Fungi.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antitumor metabolites from marine-derived fungi .....	5
1.2 Antifungal metabolites from marine-derived fungi .....	8
1.3 Miscellaneous metabolites from marine-derived fungi .....	12
<b>2 Apoptosis Mechanism of Tumor Cells.....</b>	<b>14</b>
2.1 Death Receptor Pathway.....	15
2.2 Caspases.....	17
2.3 Mitochondria Pathway .....	18
<b>3 Content and Purpose of this Thesis .....</b>	<b>18</b>
<b>Materials and Methods.....</b>	<b>20</b>
<b>1 Materials .....</b>	<b>20</b>
<b>2 Methods.....</b>	<b>26</b>
<b>Results and Analysis .....</b>	<b>38</b>
<b>1 Optimization of Culture Conditions of Clavatol.....</b>	<b>38</b>
1.1 The Standard Curve of Clavatol.....	38
1.2 Optimization of Culture Conditions and Methods.....	38
1.3 Orthogonal Test.....	40
<b>2 Preparation of Clavatol .....</b>	<b>41</b>
2.1 Shake Flask Culture for Clavatol.....	42
2.2 Isolation and Puration .....	43
<b>3 Bioactivities of Clavatol.....</b>	<b>43</b>
3.1 Antifungal Activities .....	43
3.2 Tyrosinase Inhibition Activities .....	43
3.3 Acetylcholinesterase Inhibitory Activities .....	46

3.4 Anti-oxygen Activities of Clavatol .....	48
3.5 Antitumor Activities and Mechanism of Clavatol <i>in vivo</i> . and <i>vitro</i> .....	50
3.6 Acute toxicity and anticancer test <i>in vivo</i> of Clavatol .....	61
3.7 Identification of the strain BYY-1.....	63
<b>Dissscussion and Conclusions</b> .....	<b>66</b>
<b>1 Bioactivities of Clavatol from BYY-1.....</b>	<b>66</b>
1.1Tyrosinase Inhibition Activities .....	68
1.2 Acetylcholinesterase Inhibitory Activities .....	69
1.3 Anti-oxygen Activities of Clavatol .....	70
1.4 Inducing Apoptosis by Clavatol.....	70
<b>2 Optimization of Culture Conditions of Clavatol.....</b>	<b>73</b>
<b>3 Conclusions and Prospects.....</b>	<b>75</b>
<b>References .....</b>	<b>78</b>

## 摘 要

我们课题组前期从采自福建省云霄县漳江口红树林湿地自然保护区的白骨壤树叶样品中分离到一株海洋真菌 BYY-1, 并从该菌株的次级代谢产物中分离鉴定了一个聚酮类化合物 Clavatol。初步的研究结果显示, Clavatol 发酵产量较高, 分离纯化步骤简单, 体外抗肿瘤活性强, 具有进一步的研究价值。本论文在原有的工作基础上对 Clavatol 的发酵条件进行优化, 并对该化合物的生物活性进行较系统的研究, 为 Clavatol 进一步开发及应用提供依据。

采用通过正交试验法对 Clavatol 的发酵培养基进行优化, 确定了 Clavatol 适宜的发酵培养基组成为: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 0.2%, 酵母膏 0~1.0%, 海水 0~10%, 硫酸铵 0.3%。采用该发酵培养基, 在 28℃, 160r/min 摇瓶振荡发酵 7d, Clavatol 发酵产量可达 44.6mg/L。

采用微量液体稀释法对 Clavatol 的抗菌活性进行测定, 发现其对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色假丝酵母和黑曲霉的 MIC 分别为 156、160、85、26、38 $\mu$ g/mL。

首次研究了 Clavatol 对酪氨酸酶和乙酰胆碱酯酶的抑制作用, 结果显示, Clavatol 对酪氨酸酶和乙酰胆碱酯酶的 IC<sub>50</sub> 均为 6.94 $\mu$ mol/L, 对 2 种酶的抑制作用均表现为可逆效应, 为竞争性抑制剂, 抑制常数 K<sub>i</sub> 分别为 0.166 $\mu$ mol/L 和 0.037mmol/L。Clavatol 对酪氨酸酶和乙酰胆碱酯酶的荧光发射光谱随着其浓度的增高, 内源荧光产生有规律的猝灭, 但荧光的最大发射峰位置未发生明显的位移, 说明该化合物与两种酶之间存在着相互作用。

对 Clavatol 的抗氧化活性进行测定, 首次发现 Clavatol 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 自由基和 DPPH 具有较强的清除作用, IC<sub>50</sub> 分别为 6.25 $\mu$ g/mL、7.15 $\mu$ g/mL。

采用 MTT 法对 Clavatol 的体外抗肿瘤活性进行测定, 结果显示, 该化合物对 Raji、Hela、MG-63、BGC-823、KB、HepG-2 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 24 $\mu$ g/mL、12 $\mu$ g/mL、32 $\mu$ g/mL、28 $\mu$ g/mL、16 $\mu$ g/mL 和 46 $\mu$ g/mL。

采用 DAPI 染色、流式细胞术、磷脂酰丝氨酸外翻分析、线粒体膜势能 ( $\Delta\Psi$ m) 的检测、ROS 检测、和 Western Blotting 等多种测定方法对 Clavatol 诱导肿瘤细胞凋亡的作用进行分析, 确定 Clavatol 可诱导 Hela 肿瘤细胞凋亡, 但诱导凋亡的机



制还有待进一步研究。

对Clavatol的急性毒性和体内抗肿瘤活性进行了评价, 结果显示, Clavatol对小鼠的LD<sub>50</sub>为1000-1250mg/kg体重, 对小鼠肉瘤细胞s-180的体内抑瘤实验, ED<sub>50</sub>为111.87mg/kg体重, 治疗指数达到了10.61。与目前临床上的一些抗癌药物相当, 对该药今后的研究开发有重要意义。

在前期对菌株BYY-1进行初步鉴定的基础上, 根据 rDNA ITS序列分析测序结果, 将菌株BYY-1鉴定为*Aspergillus clavatonanicus*。

本文结果表明, Clavatol发酵产量较高, 分离纯化步骤简单, 毒性较低, 抗肿瘤、抗氧化、抗酪氨酸酶和乙酰胆碱酯酶活性较强, 具有良好的开发前景。

**关键词:** 海洋真菌; 培养基优化; Clavatol; 生物活性

## Abstract

Marine Fungus has become an important part of bioactive natural products research with more and more attention been paid to the ocean discovery. Because of its unique living environment, marine fungus has produced special metabolites with unique chemical structures and vivid bioactivities. Thus, the metabolites from marine fungus may become the potential drugs in the clinic.

Secondary metabolite Clavatol from one marine fungi strain BYY-1 was observed in this study. The entire region ITS1-5.8s-ITS2 of BYY-1 was amplified by PCR. Associated with morphological character, BYY-1 was identified as *Aspergillus clavatonanicus*. Production of Clavatol was optimized by orthogonal design. Submerged fermentation was tested. The result shows that the optimal condition for Clavatol production included glucose 10g/L, peptone 2.0g/L, sea water 0~100mL/L, yeast 0~1.0g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0g/L. The production of Clavatol reached 44.6mg/L, and it equaled to 1.5 times of the production in customary half-seawater GPY medium. Meantime, the differences of Clavatol production and biomass were studied.

Clavatol was studied for its bioactivities. The result showed that Clavatol has Inhibitory activity on hydrogen peroxide-induced chemiluminescence with  $\text{IC}_{50}$  6.25 $\mu\text{g/mL}$  and the anti-oxygen activity of  $\text{IC}_{50}$  7.15 $\mu\text{g/mL}$  with DPPH free radical-scavenging assay. Clavatol has the inhibition activity of tyrosinase and AChEI with the same  $\text{IC}_{50}$  6.94 $\mu\text{mol/L}$ . The inhibition kinetic and mechanism of Clavatol was studied. It showed that the tyrosinase inhibition by Clavatol was a reversible reaction. The inhibition mechanism of Clavatol on tyrosinase and AChEI belonged to competitive inhibitor and noncompetitive inhibitor, separately. The Michaelis constants ( $K_m$ ) was 0.166 $\mu\text{mol/L}$  and 0.037mmol/L. In this study, the fluorescence intensities of the emission peaks are inversely decreased with an increasing concentration of Clavatol. Although the decline in the fluorescence intensity is caused by quenching, there is no significant  $\lambda_{\text{cm}}$  shift with the accumulation Clavatol.

Clavatol showed antitumor activity against Raji, HeLa, MG-63, BGC-823, KB, HepG-2 cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  value were 24 $\mu\text{g/mL}$ , 12 $\mu\text{g/mL}$ , 32 $\mu\text{g/mL}$ ,

28 $\mu$ g/mL 、16 $\mu$ g/mL and 46 $\mu$ g/mL. Clavatol showed moderate antimicrobial activities against *Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*、*Candida albicans* and *Aspergillus niger* with the MIC value were 156、160、85、26、38 $\mu$ g/mL respectively.

Primary anti-tumor mechanism of Clavatol was also studied. The results of morphological observation、FCM、mitochondria membrane potential、Annexin-V、ROS detection and Western blotting showed that the compound induces apoptosis of tumor cells. The exact mechanism of its anti-tumor activity needed to have further study.

Strain BYY-1 was fermented by optimal medium in Submerged fermentation manner and Clavatol were gained. The *in vivo* test showed that the compound has the toxicity to mouse with LD<sub>50</sub> 1000-1250mg/kg, and the anti-tumor activity inhibited mice sarcoma s-180 cell line with ED<sub>50</sub> 111.87mg/kg. The therapy index was 10.61.

Our study indicated that metabolite Clavatol from strain BYY-1 was worth to be researched in-depth. Compound Clavatol had the potentiality to be a new anti-tumor drug in clinic.

**Key words:** marine fungi; medium optimization; Clavatol; bioactivities.

## 前 言

### 1 海洋真菌次生代谢产物的研究概况

当前,恶性肿瘤、心脑血管疾病、老年性痴呆症等疑难病症及由耐药菌引起的感染疾病仍然严重威胁着人类的健康和生存,急需开发创新药物来缓解临床用药的压力。发现有生物活性的先导化合物是创新药物研究的前提,也是影响创新药物周期的决定性因素。长期以来,人类寻找药物先导化合物的重点一直集中在陆生生物资源。然而,随着陆地生物资源开发利用日趋达到极限,目前从陆生生物代谢产物中发现新先导化合物的几率大幅度地下降,开发新药的速度及种类远不能满足临床用药的需求,迫切需要开发新的药源。

海洋占地球总面积 71%,地球生物 80%生活在海洋。为适应海洋环境和生存需要,海洋生物演化出了不同于陆生生物的遗传背景和代谢途径,可产生与陆栖生物结构不同的生物活性物质,是寻找新药或先导化合物的宝贵资源。因此,海洋天然活性药物的研究已经成为目前天然产物化学中的一个重要分支<sup>[1]</sup>。自上世纪 60 年代来,人们开始重视海洋来源药物的研究开发。在过去的几十年间,全世界已从海洋动植物及微生物中分离鉴定了超过 15000 种不同结构类型的化合物,从中发现了不少候选药物或先导化合物。

对海洋天然产物的研究开发,最初的主要研究对象是集中在海参、海绵、珊瑚、海鞘、海藻等不同的海洋动植物上,并从中分离到了许多具有不同生物活性的化合物,其中有些具有很强的抗肿瘤活性,已进入临床前或临床研究(表 1)<sup>[9]</sup>。然而,由于大多数海洋动植物不仅资源量非常少,而且活性化合物含量低、结构复杂,因此直接利用这些海洋生物资源进行产业化开发或采用化学合成生产均受到限制。海洋微生物是海洋生态系统中的重要组成部分,不但种类繁多,代谢产物化学结构类型多样,没有海洋动植物生物量有限、分离提纯复杂、难以工业化操作的弊端,而且越来越多的实验证明一些来自海洋动植物的活性物质的真正生物源是海洋微生物。因此,作为候选药物或先导化合物的新来源,近些年来,国外许多研究单位及大制药企业将越来越多的目光投向了海洋微生物<sup>[5-7]</sup>。

表 1 部分已进入临床前或临床期研究的抗肿瘤活性海洋天然产物  
 Tab.1 Current status of marine natural products in anticancer preclinical or clinical trials

Compound (figure number)	Source organism	Chemical class	MolecuLar target	Current status
Ecteinascidin 743 (Yondelis)	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (tunicate; possible bacterial source)	Tetrahydroisoqui nolone alkaloid	TubuLin	Phase II
Dolastatin 10	<i>Dolabella auricuLaria</i> / <i>Symploca</i> sp. (mollusc/cyanobacterium)	Dolabella auricuLaria	Linear peptide	Phase II
Bryostatin 1	<i>Bryopsis neritina</i> (bryozoan)	Macrocyclic lactone	PKC	Phase II
Synthadotin (dolastatin 15 derivative)	<i>Dolabella auricuLaria</i> / <i>Symploca</i> sp. (synthetic analogue)	Linear peptide	TubuLin	Phase II
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens/Bryopsis</i> sp. (mollusc/green alga)	Cyclic depsipeptide	Lysosomes/erbBp athway	Phase II
Squalamine	<i>Squalus acanthias</i> (shark)	Aminosteroid	Phospholipid bilayer	Phase II
Dehydrodidemnin B (Aplidine)	<i>Trididemnum solidum</i> (tunicate, synthetic; possible bacterial cyanobacterial source)	Cyclic depsipeptide	Ornithine decarboxylase	Phase II
Didemnin B	<i>Trididemnum solidum</i> (tunicate)	Cyclic depsipeptide	FK-506 bp	Phase II (discontinued)
Cemadotin (dolastatin 15 derivative)	<i>Dolabella auricuLaria</i> / <i>Symploca</i> sp. (synthetic analogue)	Linear peptide	TubuLin	Phase II (discontinued)
Soblidotin (dolastatin 10 derivative)	<i>Dolabella auricuLaria</i> / <i>Symploca</i> sp. (synthetic analogue)	Linear peptide	TubuLin	Phase I

E7389 (halichondrin B derivative)	Halichondria okadai (sponge, synthetic)	Macrocyclic polyether	TubuLin	Phase I
NVP-LAQ824 (Psammaphin derivative)	Psammaphysilla sp. (sponge, synthetic)	Indolic cinnamyl hydroxamate	HDAC/DNMT	Phase I
Discodermolide	Discodermia dissoluta (sponge)	Lactone	TubuLin	Phase I
HTI-286 (Hemiasterlin derivative)	Cymbastella sp. (synthetic analogue of sponge metabolite)	Linear peptide	TubuLin	Phase I
LAF-389 (Bengamide B derivative)	Jaspis digonoxea (sponge, synthetic)	q-Lactam peptide derivative	Methionine aminopeptidase	Phase I
KRN-7000 (Agelasphin derivative)	Agelas mauritanus (sponge, synthetic)	α-Galacosylceramide	Va24 + NKT cell activation	Phase I
Cypracin A	Lyngbya majuscula (cyanobacterium)	Thiazole lipid	TubuLin	Preclinica
DMMC	Lyngbya majuscula (cyanobacterium)	Cyclic depsipeptide	TubuLin	Preclinica
Salinosporamide A	Salinospora sp. (bacterium)	Bicyclic g-lactam-h lactone	20S proteasome	Preclinica
LauLimalide	Cacospongia mycofijiensis (sponge)	Macrolide	TubuLin	Preclinica
Vitilevuamide	Didemnin cuculiferum/ Polysyncracion lithostrotum (tunicates)	Cyclic peptide	TubuLin	Preclinica
Diazonamide	Diazona angulata (tunicate)	Cyclic peptide	TubuLin	Preclinica

Eleutherobin	<i>Eleutherobia</i> sp./ <i>Erythropodium caribaeorum</i> (soft corals)	Diterpene glycoside	TubuLin	Preclinica
Sarcodictyin	<i>Sarcodictyon roseum</i> (sponge)	Diterpene	TubuLin	Preclinica
Peloruside A	<i>Mycale hentscheli</i> (sponge)	Macrocyclic lactone	TubuLin	Preclinica
Salicylhalimides A and B	<i>Haliclona</i> sp. (sponge)	Polyketide	Vo-ATPase	Preclinica
Thiocoraline	<i>Micromonospora marina</i> (bacterium)	Depsipeptide	DNA-polymerase	Preclinica
Ascididemin	<i>Didemnum</i> sp. (sponge)	Aromatic alkaloid	Caspase- 2/ mitochondria	Preclinica
Variolins	<i>Kirkpatrickia variolosa</i> (sponge)	Heterocyclic alkaloid	Cdk	Preclinica
Lamellarin D	<i>Lamellaria</i> sp. (mollusc and various soft corals)	Pyrrole alkaloid	Topoisomerase I /mitochondria	Preclinica
Dictyodendrins	<i>Dictyodendrilla</i> <i>verongiformis</i> (sponge)	Pyrrolocarbazole derivatives	Telomerase	Preclinica
ES-285 (Spisyllosine)	<i>Mactromeris polynyma</i> (mollusc)	Alkylamino alcohol	Rho (GTP- bp)	Preclinica
Dolastatin 15	<i>Dolabella auriculata</i> (mollusc)	Linear peptide	TubuLin	Preclinical (discontinued)
Halichondrin B	<i>Halichondria okadae</i> (sponge)	Macrocyclic polyether	TubuLin	Preclinical (discontinued)

海洋微生物包括海洋细菌、海洋放线菌、微藻和海洋真菌。国内外对海洋细菌及放线菌活性天然产物的研究起步较早,研究较深入,发现的新化合物的数量也较多。相比之下,对海洋真菌的研究进展较缓慢。1945年, Giuseppe Brotzu 从海水中分离得到了一株与顶头孢霉相似的真菌,具有抗细菌的活性,这个观察报告通向了海洋真菌的研究大门<sup>[11]</sup>。1983年,从 *Tolypocladium inflatum* 分离出来的环孢菌素 A 被批准作为临床应用的免疫抑制剂极大地刺激了科学家对海洋真菌次生代谢产物研究的兴趣。1986年, G.A.Schiehser 发表了第一个从海洋真菌中分离出有抗菌活性的天然产物 Leptosphaerin。1994年开始发现新化合物的速率才有所增加,进入较快发展阶段。目前已从海洋真菌中发现许多结构新颖,具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抑制细胞周期、及拮抗血小板活化因子等不同生物活性的化合物<sup>[8]</sup>,海洋真菌产生的这些次生代谢产物可能是由于对其独特环境生存压力的适应<sup>[13]</sup>。显示出良好的开发前景。

### 1.1 抗肿瘤活性化合物

近几年来,国内外研究人员从海洋真菌代谢产物中分离到许多抗肿瘤活性化合物(表2),其中有些结构新颖,抗癌谱广,活性很高,具有良好的开发应用前景。

Sansalvamide 是 Fenical 研究小组从 Bahamas 岛的海草 *Halodule wrightii* 表面分离得到的一株 *Fusarium* 属真菌中分离得到的一个新环肽化合物,见图1,美国国家癌症研究所(NCI)测定了其对60种细胞株的细胞毒活性,平均  $IC_{50}$  为  $27.4\mu\text{g/mL}$ ,其对结肠癌细胞株 COLO205 和黑色素瘤细胞株 SK-MEL-2 的  $IC_{50}$  分别为 3.5 和  $5.9\mu\text{g/mL}$ ,这与 FDA 核准的一些抗肿瘤药物比较,如 mitomycin C 对以上两种细胞的  $IC_{50}$  为  $5.3\mu\text{g/mL}$ <sup>[15, 16]</sup>, Sansalvamide 表现出高细胞毒活性<sup>[14]</sup>。

Olga F. Smetanina 等从海洋真菌 *Penicillium janthinellum* 中分离出三个新吡啶生物碱化合物 Shearinines D, E, and F。Shearinines D, E 可诱导人白血病细胞 HL-60 的凋亡。shearinine E 也可抑制 EGF 诱导的 JB6 P<sup>+</sup> Cl 41 的恶性转化<sup>[20]</sup>。

中山大学林永成教授的研究小组对海洋红树林内生菌次生代谢产物方面做了较系统的研究,在对南海海岸红树林内生真菌的研究中发现了许多结构新颖、具有良好生物活性的化合物<sup>[30, 31]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库